# 柑橘内生真菌的分离鉴定及其发酵产物对柑橘溃疡病菌的抑制活性

颜桢灵[1,2,3]，陈洁萍[1,2,3]，农小霞[1,2,3]，李鑫[1,2,3]，骆海玉[1,2,3*]，韦柳柳[1,2,3]，
阮家欢[1,2,3]，关祥媛[1,2,3]，陆莎[1,2,3]

（1. 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室，广西 桂林 541006；2. 广西珍稀濒危动物生态学重点实验室，广西 桂林 541006；3. 广西师范大学 生命科学学院，广西 桂林 541006）

**摘要**：本研究从柑橘抗病品种的健康植株不同组织中分离纯化和鉴定内生真菌，并测定其发酵产物对柑橘溃疡病菌的抑制活性，以明确柑橘抗病品种中内生真菌的组成及其产抗柑橘溃疡病菌活性代谢产物的潜力，为柑橘溃疡病抗菌剂的开发奠定基础。通过组织培养法分离内生真菌，采用形态学和分子生物学方法对其进行鉴定；基于前期的拮抗预试验结果，选取代表性菌株进行发酵培养，通过乙酸乙酯浸提，真空抽滤、旋转蒸发浓缩制备粗提物；采用带毒平板涂布法测定不同菌株发酵产物乙酸乙酯提取物对柑橘溃疡病菌的抑制活性。结果表明：共分离得到 72 株内生真菌，归为 2 门（Ascomycota、Basidiomycota）、14 个属，其中优势属为刺盘孢属（*Colletotrichum*）、球座菌属（*Guignardia*）、链格孢属（*Alternaria*）和镰刀属（*Fusarium*）。不同柑橘品种中内生真菌多样性指数为温州蜜柑（桂林）>沙糖桔（桂林）>沙糖桔（梧州）。不同组织中内生真菌多样性变化因地理位置差异而有所不同，采自桂林的温州蜜柑和沙糖桔均为叶片中的内生真菌的多样性高于枝条，而采自梧州的沙糖桔为叶片中的多样性低于枝条，并且采自梧州的柑橘样品与采自桂林的柑橘样品中的内生真菌相似性低。测定了 30 株内生真菌乙酸乙酯提取物对柑橘溃疡病菌的抑制活性，其中 29 株菌株表现出不同程度抑制活性。不同柑橘品种中的优势属的 MIC 介于 0.312 5~10 mg • $mL^{-1}$，特有属的 MIC 介于 0.156~5 mg mL$^{-1}$，共有属 *Fusarium* 的 MIC 介于 0.312 5~2.5 mg • $mL^{-1}$。研究结果表明柑橘抗病品种中内生真菌具有丰富多样性，并且其发酵提取物普遍对柑橘溃疡病菌具有抑制作用。特有属抑菌活性总体优于优势属，共有属 *Fusarium* 在不同柑橘抗病品种中均具有显著抑菌效果。

**关键词**：柑橘内生真菌，柑橘溃疡病菌，乙酸乙酯提取物，最低抑制浓度

**中图分类号**：Q939.99　　　　**文献标识码**：A

# Isolation and identification of endophytic fungi from citrus cultivars and their inhibitory activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causing citrus canker

**收稿日期**：2020-08-16

**基金项目**：广西自然科学基金面上项目（2018GXNSFAA281013）；广西珍稀濒危动物生态学重点实验室研究基金（GKN. 17-A-02-02）；广西师范大学生态学博士点建设经费资助（EDPC 2018002）；2019 年广西壮族自治区大学生创新创业训练计划项目(201910602257, 202010602252)[Supported by Natural Science Foundation of Guangxi, China (2018GXNSFAA281013); Guangxi Key Laboratory of Rare and Endangered Animal Ecology, Guangxi Normal University (GKN. 17-A-02-02); Ecological Doctoral Program Construction of Guangxi Normal University (EDPC 2018002); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Guangxi (201910602257, 202010602252)]。

**作者简介**：颜桢灵（1995-），女，广西钦州人，硕士研究生，主要从事天然产物开发与利用研究，(E-mail) 2604001959@qq.com。

*__通信作者__：骆海玉，博士，讲师，主要从事生物源活性物质与有害生物防控研究，(E-mail) luohaiyu69@163.com。

YAN Zhenling[1,2,3], CHEN Jieping[1,2,3], NONG Xiaoxia[1,2,3], LI Xin[1,2,3], LUO Haiyu[1,2,3*], WEI Liuliu[1,2,3], RUAN Jiahuan[1,2,3], GUAN Xiangyuan[1,2,3], LU Sha[1,2,3]

（1. *Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection*, *Ministry of Education*, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. *Guangxi Key Laboratory of Rare and Endangered Animal Ecology*, Guilin 541006, Guangxi, China; 3. *College of Life Sciences*, *Guangxi Normal University*, Guilin 541006, Guangxi, China）

**Abstract:** In this study, to provide a basis for the controlling of citrus canker disease, endophytic fungi from different citrus disease-resistant cultivars were isolated and identified by using tissue culture method, and morphology combined with molecular method, respectively. Representative endophytic fungi were selected based on the antagonism results in pre-experimental, to determine the antibacterial activity with their ethyl acetate extracts from the fermented culture against pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, using toxic medium coating method. The results were as follows: A total of 72 endophytic fungi were obtained from different citrus cultivars *Citrus unshiu* Marc., *C. reticulata* Blanco cv. Shatangju and *C. reticulata* Blanco cv. Shatangju, classified into 14 genera. Fungal isolates belong to phylum Ascomycota and Basidiomycota. The frequent genera were *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Alternaria* and *Fusarium*. The diversity indices of endophytic fungi from different citrus as follow: *Citrus unshiu* Marc. (Guilin) > *C. reticulata* Blanco cv. Shatangju (Guilin) > *C. reticulata* Blanco cv. Shatangju (Wuzhou). The diversity indices of endophytic fungi were different, which were isolated from different tissues of citrus associated with different geographical location. The similarity of endophytic fungi in the citrus samples collected from Wuzhou and those from Guilin was low. The antibacterial activity of ethyl acetate extracts from the fermented culture of 30 endophytic fungi were determined against pathogen *X. citri* subsp. *citri in vitro* assay. Most of their extracts exhibited significant inhibition. Among them, the MIC of dominant genera, specific genera and shared genus ranged from 0.312 5-10 mg·mL$^{-1}$, 0.156-5 mg·mL$^{-1}$ and 0.312 5-2.5 mg·mL$^{-1}$, respectively. The results indicated that the endophytic fungi in citrus disease-resistant cultivars were rich in diversity, and most of their extracts exhibited inhibition against *X. citri* subsp. *citri*. The antibacterial activity of specific genera is generally better than the dominant genera. All of the strains in the shared genus *Fusarium* displayed significant inhibition against *X. citri* subsp. *citri*.

**Key words**: citrus endophytic fungi, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, ethyl acetate extract, minimum inhibitory concentration (MIC)

柑橘溃疡病（citrus bacterial canker disease，CBCD）是影响全球柑橘种植业发展的重大检疫性病害，对柑橘产业危害严重(陈先锋等, 2017)。其病原是柑橘黄单胞杆菌(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)，同物异名为(*X. campestris* pv. *citri* 或 *X. axonopodis* pv. *citri*)（姚廷山等, 2015)，具有易传播、难防治的特点（Savietto et al., 2018)。每年需使用大量化学药剂对其进行防治。但随着传统化学药剂的长期反复使用，导致的农药残留、环境污染、耐药菌株等问题不断增加（Lamichhane et al., 2017)。因此，亟需寻找和开发高效、低毒的新型抗菌剂。

植物内生真菌作为一类特境微生物，已成为寻找和开发抗菌活性天然产物的重要资源。植物内生真菌是指在其生活史中的某一阶段或全部阶段存在于健康植物体组织中，但并不引起宿主植物产生明显病害症状，并且与宿主植物互利共生的真菌(Abdalla & Matasyoh，2014)。植物内生真菌不仅可通过分泌次生代谢产物或刺激宿主产生活性物质提高宿主防御病害能力（Rodriguez et al., 2009; Ding et al., 2013)，并且一些植物内生真菌离开宿主后，还可通过人工培养发酵产生抗菌活性物质（Venugopalan & Srivastava, 2015)，为大规模生产防菌剂提供可能。利用植物内生真菌代谢产物防治植物病害已有较多研究报道（Fe Andrés et al., 2017)。尤其是近年来，对作物中内生真菌组成及其对宿主病害防治作用的研究，持续成为

当前内生真菌研究领域关注的热点（Nicoletti, 2019）。利用柑橘内生真菌代谢产物防治柑橘病害的研究已有少量报道，如郭东升等（2020）研究发现柑橘果实中的一株内生燕麦镰刀菌（*Fusarium avenaceum* Gds-1）对柑橘青霉病具有高效稳定的防治效果，以其无菌发酵滤液单独施用 28 d 和 56 d 时，对柑橘青霉病的防效与 100 μg·mL$^{-1}$ 的抑霉唑相当。Pena et al.（2017）从柑橘中筛选获得一株内生真菌 *Muscodor* sp. LGMF1254 产生的挥发性物质对柑橘黑斑病原菌菌丝和孢子具有显著抑制活性，并且能有效控制离体叶片组织病斑形成。Tran et al.（2019）发现提前在柑橘果实上接种柑橘内生真菌 *Phyllosticta capitalensis* 和 *P. paracapitalensis* 也可有效控制柑橘黑斑病的发生。

柑橘中含有丰富的内生真菌资源（Nicoletti, 2019），并且不同柑橘品种中内生真菌的组成可能不同。任建国（2006）研究广西主要柑橘品种对柑橘溃疡病的抗性，发现无核沙糖桔和温州蜜柑均为抗病品种。吴思梦（2018）研究发现从抗病品种温州蜜柑中分离的拮抗内生细菌较感病品种纽荷尔脐橙多，且感病品种纽荷尔脐橙中同时存在拮抗细菌和感病协同菌。但有关柑橘抗病品种中内生真菌的组成与其对柑橘抗溃疡病菌的作用关系，以及柑橘抗病品种中的内生真菌能否产生抑制柑橘溃疡病菌的活性产物等方面的研究尚未见报道。本研究旨在从柑橘抗病品种温州蜜柑和沙糖桔中分离纯化并鉴定内生真菌，明确其内生真菌组成，并通过离体抗菌活性的评估，探究柑橘内生真菌产抗柑橘溃疡病菌活性成分的潜力，为其后期应用于柑橘溃疡病的防治提供依据。



## 1 材料与方法

### 1.1 柑橘样品及柑橘内生真菌的分离

健康柑橘叶片和枝条于 2016 年 11 月，分别采自：广西桂林市柑橘研究所（温州蜜柑）；广西桂林市二塘乡骆家寨（沙糖桔）；广西梧州市苍梧县（沙糖桔）。每个地点随机选取 5 株健康柑橘植株（3 年以上株龄），共 15 株。在柑橘植株上选取 4 条颜色为暗绿色、枝径粗约为 0.4 cm、带有深绿色叶片的枝条，用枝剪从枝条基部上方约 3 cm 处剪断，将剪取的枝叶做好标记，总共采集 60 份样品。装至保鲜袋中带回实验室，立即进行内生真菌的分离纯化。柑橘样品叶片和枝条中的内生真菌分离纯化参照 Lou et al.（2013）、王利娟和贺新生（2006）、徐祥林等（2019）的方法。

### 1.2 柑橘溃疡病菌

柑橘溃疡病菌为广西师范大学珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室化学生态实验室于 2017 年 12 份分离和保存的菌种。

### 1.3 内生真菌的鉴定

主要采用形态学和分子生物学的方法对内生真菌进行鉴定。形态学鉴定主要以不同培养基（PDA、CMA、NGA）对分离得到的内生真菌进行培养，观察菌落形态、颜色、边缘形状、生长速率、基质颜色等，以及其显微镜结构特征（如菌丝有无分隔、分支，分生孢子形态、大小，产孢结构特征等），结合《真菌鉴定手册》（魏景超，1979）、相关文献、实验室已知菌种进行鉴定。分子鉴定主要通过内生真菌的 rDNA-ITS 序列对其进行鉴定。以真菌通用引物 ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）和 ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）扩增菌株 ITS 碱基序列，委托北京六合华大基因科技有限公司武汉分公司进行检测纯化及测序。所获的测序结果与 GenBank 中的序列进行 BLAST 比对，选择相似度最高的菌株，以 MEGA X软件 Neighbor-joining（NJ）构建系统发育树，进行同源性分析，进行自展次数为 1 000 的置信度检测，根据系统发育树中的组群关系对菌株进行分类。

### 1.4 内生真菌的多样性指数统计分析方法

内生真菌的多样性指数统计分析主要参考徐祥林等（2019）、Chowdhary & Kaushik（2015）的方法。具体如下：

相对频率（relative frequency，*RF*）：分离到某种属内生真菌的菌株数量占分离到的所有

总菌株数量的百分数，即 *RF*（%）=（某种属内生真菌菌株数量/分离到的所有内生真菌总菌株数）×100。

多样性指数（*H'*）：根据 Shannon-Weiner 指数公式计算，即 $H' = -\sum_{i=1}^{k} Pi \times \ln Pi$，式中： *k* 为某种植物或组织中内生真菌种类的总数；*Pi* 为某种属内生真菌的菌株数量占分离到的所有总菌株数量的百分数。

相似性系数（*CS*）是根据 Sorenson 系数公式计算，即 *CS*=2*j*/（*a*+*b*），式中：*j* 是两种组织中具有的相同内生真菌种类数；*a* 是一种组织中内生真菌的种类数；*b* 是另一组织中内生真菌的种类数。相似性系数可以比较两种组织之间内生真菌种类组成的相似程度。

### 1.5 内生真菌的发酵培养及粗提物制备

无菌条件下，用打孔器（直径 4 mm）在已经活化好的菌落边缘处打孔，取 3 块菌饼接入含有马铃薯葡萄糖液体培养基（PDB，150 mL）的锥形瓶（250 mL）中，置于恒温摇床上，（28±1）℃，150 r·min$^{-1}$ 震荡培养。培养 3~5 d 后，即可得到发酵种子液。取 5 mL 种子液接种于事先准备好的大米固体培养基，放置培养箱中，（28±1）℃培养 60 d。

将发酵好的产物进行干燥、粉碎处理，用适量乙酸乙酯浸泡提取 3 次，真空抽滤，合并 3 次提取滤液，用旋转蒸发仪浓缩蒸干，即得到内生真菌发酵产物的乙酸乙酯粗提物。

### 1.6 抑菌活性测定

采用带毒平板涂布法（慕立义, 1994），用丙酮将样品溶解配制成药液，将药液与热熔冷却至 50~55 ℃的牛肉膏培养基按 1∶9 混合均匀后，倒入 6 cm 培养皿（每皿 5 mL），对照组以丙酮纯溶剂代替药液。待凝固后，吸取 50 μL 柑橘溃疡病菌悬浮液（浓度约 $10^6$~$10^7$ cfu·mL$^{-1}$）至培养基表面，用无菌涂布棒涂布均匀。每处理设 3 个重复，置于（28±1）℃恒温培养 72 h，观察和记录细菌生长情况，以“+”代表有菌生长，“-”代表无菌生长。对于有活性的内生真菌发酵物，进一步测定其最低抑制浓度（MIC），配制系列梯度浓度药液，按照如上方法操作，以病原菌不生长的最小浓度为最低抑制浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 柑橘内生真菌的定殖率和分离率

从不同柑橘品种的叶片和枝条中总共分离得到 72 株内生真菌（表 1）。其中，从温州蜜柑中分离得到 50 株，包括叶片 40 株、枝条 10 株。从桂林采集的沙糖桔中分离得到 7 株，包括叶片 4 株、枝条 3 株。从梧州采集的沙糖桔中分离得到 15 株，包括叶片 2 株、枝条 13 株。不同采集地的柑橘抗病品种的不同组织中内生真菌数量变化有所不同，采自桂林的柑橘抗病品种的叶片中内生真菌数量均高于枝条中的，而在采自梧州的柑橘抗病品种中，则为叶片中内生真菌数量低于枝条中的。

表 1 不同柑橘样品叶片和枝条中分离内生真菌数量

Table 1 Number of the endophytic fungi isolated from the leaves and twigs of different citrus cultivars

| 宿主 Host | 采集地 Collection place | 经纬度 Longitude and latitude | 菌株数量 Number of the isolates | | 总计 Total |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 叶片 Leaves | 枝条 Twigs | |
| 温州蜜柑 *Citrus unshiu* Marc. | 广西桂林七星区 Qixing District, Guilin, Guangxi | 110°19′44″ E 25°16′13″ N | 40 | 10 | 72 |
| 沙糖桔 *Citrus reticulata* Blanco cv. | 广西桂林象山区 Xiangshan District, | 110°16′36″ E 25°11′5″ N | 4 | 3 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Shatangju<br>沙糖桔<br>*Citrus reticulata* Blanco cv.<br>Shatangju | Guilin, Guangxi<br>广西梧州苍梧县<br>Cangwu County,<br>Wuzhou, Guangxi | 111°1′18″ E<br>23°29′46″ N | 2 | 13 |

**2.2 柑橘内生真菌的鉴定**

根据菌株菌落形态、颜色、生长速度、边缘形状、基质颜色以及显微结构，将菌株归为2门（子囊菌门和担子菌门）、14属（表2）。其中担子菌门仅含1科1属，其余均归为子囊菌门。选取30株代表菌株进行分子鉴定，将其ITS序列在GenBank中进行BLAST比对，选取相似度最高的已知属种的序列，采用MEGA X软件以NJ法构建系统进化树（图1），分析其同源性。基于ITS序列的BLAST比对结果与系统进化同源性分析，结合形态学特征，30株内生鉴定结果及GenBank序列号如表3所示，包含14个属：链格孢属（*Alternaria*）、短梗霉属（*Aureobasidium*）、枝孢属（*Cladosporium*）、刺盘孢属（*Colletotrichum*）、棒孢属（*Corynespora*）、弯孢霉属（*Curvularia*）、间座壳属（*Diaporthe*）、附球菌属（*Epicoccum*）、镰刀属（*Fusarium*）、小球腔菌属（*Leptosphaeria*）、炭垫菌属（*Nemania*）、黑孢属（*Nigrospora*）、球座菌属[*Guignardia* (*Phyllosticta*)]、裂褶菌属（*Schizophyllum*）。

分子鉴定结果与形态鉴定基本一致。其中，在系统进化树中，内生真菌LJZ-J-4、WZMG-Y-24和WZMG-Y-4所聚集的分支包含*Guignardia mangiferae*（有性型）和*Phyllosticta capitalensis*（无性型）。对于菌株LJZ-J-4和WZMG-Y-24，它们的分生孢子大小为（8~）10~12 μm×（5~）6~7 μm，有透明的、黏液样的顶端附着物（7~13 μm×1~1.5 μm），尖端锥状，这些特征与*Guignardia mangiferae*分生孢子特征一致，并显著区别于*Phyllosticta capitalensis*的分生孢子（Glienke et al., 2011; Guarnaccia et al., 2017）。因此，将内生真菌LJZ-J-4和WZMG-Y-24鉴定为*Guignardia mangiferae*。由于未观察到WZMG-Y-4的分生孢子，难以区分其归属的种，本研究将WZMG-Y-4暂时鉴定至*Phyllosticta* sp.，有待进一步鉴定。此外，由于rDNA-ITS序列分析存在的不足，例如进行序列比对的数据库需不断完善（据估计GenBank中约有10%~20%的真菌序列存在错误鉴定），以及对于某些物种其ITS区序列可变的程度相对不高，不足以用来分析其属种或组群间的差异等（燕勇等，2008；郑冰等，2011 李营等，2015），后续还需结合深入的、系统性的形态研究对菌株进行准确鉴定。

不同柑橘样品中内生真菌分布及种属差异较大。在分离的内生真菌中，温州蜜柑中共包含有8个属，优势属为*Colletotrichum*（27.78%）、*Alternaria*（15.28%）、*Guignardia* (*Phyllosticta*)（13.89%）。桂林采集的沙糖桔中共包含5个属：*Leptosphaeria*、*Guignardia* (*Phyllosticta*)、*Fusarium*、*Nemania*、*Nigrospora*，除了*Leptosphaeria*、 *Guignardia* (*Phyllosticta*)的相对频率为2.78%外，其他各属的相对频率均为1.39%。梧州采集的沙糖桔中共包含5个属，优势属为*Fusarium*（11.11%）、*Epicoccum*（4.17%）、*Colletotrichum*（2.78%）。*Alternaria*、*Diaporthe*、*Aureobasidium*、*Cladosporium*仅分布在温州蜜柑中；*Nemania*、*Nigrospora*、*Leptosphaeria*仅分布在桂林采集的沙糖桔中；*Curvularia*、*Epicoccum*、*Corynespora*仅分布在梧州采集的沙糖桔中。

不同组织部位中的内生真菌种属差异较大。*Alternaria*、*Diaporthe*、*Nemania*和*Nigrospora*仅分布在叶片中，*Aureobasidium*、*Cladosporium*、*Leptosphaeria*、*Curvularia*、*Epicoccum*、*Corynespora*、*Schizophyllum*仅分布在枝条中。

表2 柑橘内生真菌组成及相对频率

Table 2 Endophytic fungi isolated from different citrus cultivars and their relative frequency

| 分类地位<br>Classificatory station | 分离菌株数目/相对频率（%）<br>Number of the isolates / Relative frequency( *RF*, %) | 总计<br>Total |
|---|---|---|

| 门 Phyla | 纲 Classes | 科 Families | 属 Genus | 温州蜜柑（桂林） *Citrus unshiu* Marc. (Guilin) | | | 沙糖桔（桂林） *Citrus reticulata* Blanco cv. Shatangju (Guilin) | | | 沙糖桔（梧州） *Citrus reticulata* Blanco cv. Shatangju (Wuzhou) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 叶片 Leaves | 枝条 Twigs | 小计 Subtotal | 叶片 Leaves | 枝条 Twigs | 小计 Subtotal | 叶片 Leaves | 枝条 Twigs | 小计 Subtotal | |
| 子囊菌门 Ascomycota | 座囊菌纲 Dothideomycetes | 孢腔菌科 Pleosporaceae | 链格孢属 *Alternaria* | 11/15.28[a] | 0 | 11/15.28[a] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11/15.28 |
| | | | 弯孢属 *Curvularia* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/1.39 | 1/1.39 | 1/1.39 |
| | | 亚隔孢壳科 Didymellaceae | 附球菌属 *Epicoccum* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3/4.17 | 3/4.17 | 3/4.17 |
| | | 小球腔菌科 Leptosphaeriaceae | 小球腔菌属 *Leptosphaeria* | 0 | 0 | 0 | 0 | 2/2.78 | 2/2.78 | 0 | 0 | 0 | 2/2.78 |
| | | Saccotheciaceae | 短梗霉属 *Aureobasidium* | 0 | 1/1.39 | 1/1.39 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/1.39 |
| | | 枝孢霉科 Cladosporiaceae | 枝孢属 *Cladosporium* | 0 | 1/1.39 | 1/1.39 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/1.39 |
| | | 棒孢科 Corynesporascaceae | 棒孢属 *Corynespora* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/1.39 | 1/1.39 | 1/1.39 |
| | | 叶点霉科 Phyllostictaceae | 球座菌属 *Guignardia* (*Phyllosticta*) | 8/11.11 | 2/2.78 | 10/13.89 | 1/1.39 | 1/1.39 | 2/2.78 | 0 | 0 | 0 | 12/16.67 |
| | 子囊菌纲 Sordariomycetes | 间座壳科 Diaporthaceae | 间座壳属 *Diaporthe* | 2/2.78 | 0 | 2/2.78 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2/2.78 |
| | | 小丛壳科 Glomerellaceae | 刺盘孢属 *Colletotrichum* | 18/25.00 | 2/2.78 | 20/27.78 | 0 | 0 | 0 | 2/2.78 | 0 | 2/2.78 | 22/30.56 |
| | | 丛赤壳科 Nectriaceae | 镰刀菌属 *Fusarium* | 1/1.39 | 0 | 1/1.39 | 1/1.39 | 0 | 1/1.39 | 0 | 8/11.11 | 8/11.11 | 10/13.89 |
| | | 炭角菌科 Xylariaceae | 炭垫菌属 *Nemania* | 0 | 0 | 0 | 1/1.39 | 0 | 1/1.39 | 0 | 0 | 0 | 1/1.39 |
| | | 假毛壳球科 Trichosphaeriaceae | 黑孢属 *Nigrospora* | 0 | 0 | 0 | 1/1.39 | 0 | 1/1.39 | 0 | 0 | 0 | 1/1.39 |
| 担子菌门 Basidiomycota | 伞菌纲 Agaricomycetes | 裂褶菌科 Schizophyllaceae | 裂褶菌属 *Schizophyllum* | 0 | 4/5.56 | 4/5.56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4/5.56 |

注：11/15.28 表示该属菌株总数量为 11，该属内生真菌相对频率为 15.28%，其他的相同表示方法意义与此相同。

Note: 11/15.28 means the number of the isolates was 11 and relative frequency was 15.28%, the other is similar.

表 3 柑橘内生真菌分子鉴定结果

Table 3 Molecular identification of endophytic fungi obtained from different tissues of citrus cultivars based on ITS rDNA analysis

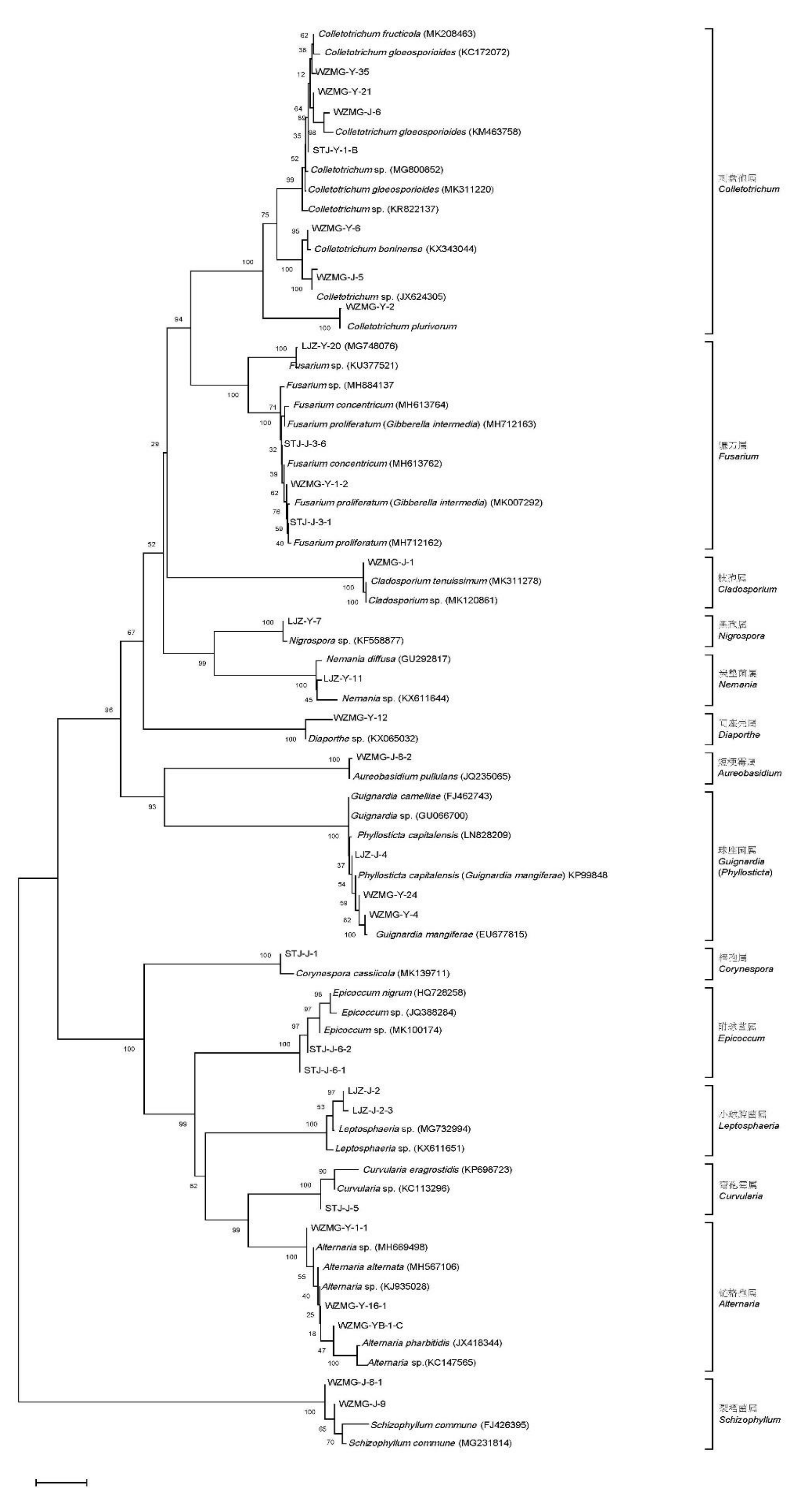
| 分离菌株[a] Fungal isolate[a] | 分离部位 Tissues | 相似菌株（基因登录号） Closest identified relative (GenBank acc. No.) | 覆盖率 Query coverage (%) | 相似度 Identity (%) | 推荐菌株（基因登录号） Proposed species or taxonomic group (GenBank accession number) |
|---|---|---|---|---|---|
| WZMG-Y-1-1 | 叶 Leaves | *Alternaria alternata* (MH567106) *Alternaria* sp. (MH669498) | 100 | 100 | *Alternaria* sp. (MK351430) |
| WZMG-Y-16-1 | 叶 leaves | *Alternaria* sp. (KJ935028) | 100 | 100 | *Alternaria* sp. (MK351432) |
| WZMG-YB-1-C | 叶 Leaves | *Alternaria pharbitidis* (JX418344) *Alternaria* sp. (KC147565) | 99 | 99 | *Alternaria* sp. (MK351434) |
| WZMG-J-8-2 | 枝 Twigs | *Aureobasidium pullulans* (JQ235065) | 100 | 99 | *Aureobasidium pullulans* (MK351435) |
| WZMG-J-1 | 枝 Twigs | *Cladosporium tenuissimum* (MK311278) *Cladosporium* sp. (MK120861) | 100 | 100 | *Cladosporium* sp. (MK351436) |
| WZMG-Y-6 | 叶 Leaves | *Colletotrichum boninense* (KX343044) | 99 | 100 | *Colletotrichum boninense* (MK351438) |
| STJ-Y-1-B | 叶 Leaves | Colletotrichum gloeosporioides (MK311220) *Colletotrichum* sp. (MG800852) *Colletotrichum fructicola* (MK208463) | 100 | 100 | *Colletotrichum* sp. (MK351439) |
| WZMG-Y-21 | 叶 Leaves | *Colletotrichum gloeosporioides* (MK311220) *Colletotrichum* sp. (MG800852) *Colletotrichum fructicola* (MK208463) | 100 | 100 | *Colletotrichum* sp. (MK351440) |
| WZMG-J-6 | 枝 Twigs | *Colletotrichum gloeosporioides* (KM463758) | 97 | 99 | *Colletotrichum* sp. (MK351441) |
| WZMG-Y-35 | 叶 Leaves | *Colletotrichum gloeosporioides* (KC172072) *Colletotrichum* sp. (KR822137) | 99 | 99 | *Colletotrichum* sp. (MK351442) |
| WZMG-Y-2 | 叶 Leaves | *Colletotrichum plurivorum* (MG748076) | 100 | 100 | *Colletotrichum plurivorum* |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | (MK351443) |
| WZMG-J-5 | 枝 Twigs | *Colletotrichum* sp. (JX624305) | 96 | 99 | *Colletotrichum* sp. (MK351444) |
| STJ-J-1 | 枝 Twigs | *Corynespora cassiicola* (MK139711) | 100 | 100 | *Corynespora cassiicola* (MK351445) |
| STJ-J-5 | 枝 Twigs | *Curvularia eragrostidis* (KP698723) *Curvularia* sp. (KC113296) | 99 | 100 | *Curvularia* sp. (MK351446) |
| WZMG-Y-12 | 叶 Leaves | *Diaporthe* sp. (KX065032) | 97 | 98 | *Diaporthe* sp. (MK351437) |
| STJ-J-6-1 | 枝 Twigs | *Epicoccum nigrum* (HQ728258) *Epicoccum* sp. (JQ388284) 100 99.62 | 100 | 100 | *Epicoccum* sp. (MK351447) |
| STJ-J-6-2 | 枝 Twigs | *Epicoccum nigrum* (HQ728258) *Epicoccum* sp. (MK100174) | 99 | 99 | *Epicoccum* sp. (MK351448) |
| STJ-J-3-1 | 枝 Twigs | *Fusarium* sp. (MH884137.1) *Fusarium concentricum* (MH613764) *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*) (MK007292) | 100 | 100 | *Fusarium* sp. (MK351449) |
| STJ-J-3-6 | 枝 Twigs | *Fusarium concentricum* (MH613764) *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*) (MH712163) | 99 | 100 | *Fusarium* sp. (MK351450) |
| LJZ-Y-20 | 叶 Leaves | *Fusarium* sp. (KU377521) | 99 | 100 | *Fusarium* sp. (MK351451) |
| WZMG-Y-1-2 | 叶 Leaves | *Fusarium concentricum* (MH613762) *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*) (MH712162) | 100 | 99 | *Fusarium* sp. (MK351452) |
| LJZ-J-2 | 枝 Twigs | *Leptosphaeria* sp. (MG732994) | 97 | 99 | *Leptosphaeria* sp. (MK351453) |
| LJZ-J-2-3 | 枝 Twigs | *Leptosphaeria* sp. (KX611651) | 98 | 99 | *Leptosphaeria* sp. (MK351454) |
| LJZ-Y-11 | 叶 Leaves | *Nemania diffusa* (GU292817) *Nemania* sp. (KX611644) | 99 | 99 | *Nemania* sp. (MK351455) |
| LJZ-Y-7 | 叶 Leaves | *Nigrospora* sp. (KF558877) | 100 | 100 | *Nigrospora* sp. (MK351456) |
| LJZ-J-4 | 枝 Twigs | *Phyllosticta capitalensis* (*Guignardia mangiferae*) (KP998485) *Guignardia camelliae* (FJ462743) *Guignardia* sp. (GU066700) | 99 | 100 | *Guignardia mangiferae* (MK351457) |
| WZMG-Y-24 | 叶 Leaves | *Phyllosticta capitalensis* (*Guignardia mangiferae*) (LN828209) *Guignardia camelliae* (FJ462743) *Guignardia* sp. (GU066700) | 100 | 100 | *Guignardia mangiferae* (MK351458) |
| WZMG-Y-4 | 叶 Leaves | *Phyllosticta capitalensis* (EU677815) | 99 | 99 | *Phyllosticta* sp. (MK351459) |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| WZMG-J-8-1 | 枝 Twigs | *Schizophyllum commune* (FJ426395) | 98 | 99 | *Schizophyllum commune* (MK351460) |
| WZMG-J-9 | 枝 Twigs | *Schizophyllum commune* (MG231814) | 99 | 99 | *Schizophyllum commune* (MK351461) |

注：[a] 以 WZMG、LJZ 和 STJ 前缀编号的菌株分别表示分离自温州蜜柑（*C. unshiu* Marc.，桂林）、沙糖桔（*C. reticulata* Blanco cv. Shatangju，桂林）和沙糖桔（*C. reticulata* Blanco cv. Shatangju，梧州）。下同。

Note: [a] Isolates with prefix WZMG, LJZ and STJ were isolated from *C. unshiu* Marc. (Guilin), *C. reticulata* Blanco cv. Shatangju (Guilin) and *C. reticulata* Blanco cv. Shatangju (Wuzhou), respectively. The same below.


Colletotrichum fructicola (MK208463)
Colletotrichum gloeosporioides (KC172072)
WZMG-Y-35
WZMG-Y-21
WZMG-J-6
Colletotrichum gloeosporioides (KM463758)
STJ-Y-1-B
Colletotrichum sp. (MG800852)
Colletotrichum gloeosporioides (MK311220)
Colletotrichum sp. (KR822137)
WZMG-Y-6
Colletotrichum boninense (KX343044)
WZMG-J-5
Colletotrichum sp. (JX624305)
WZMG-Y-2
Colletotrichum plurivorum
LJZ-Y-20 (MG748076)
Fusarium sp. (KU377521)
Fusarium sp. (MH884137
Fusarium concentricum (MH613764)
Fusarium proliferatum (Gibberella intermedia) (MH712163)
STJ-J-3-6
Fusarium concentricum (MH613762)
WZMG-Y-1-2
Fusarium proliferatum (Gibberella intermedia) (MK007292)
STJ-J-3-1
Fusarium proliferatum (MH712162)
WZMG-J-1
Cladosporium tenuissimum (MK311278)
Cladosporium sp. (MK120861)
LJZ-Y-7
Nigrospora sp. (KF558877)
Nemania diffusa (GU292817)
LJZ-Y-11
Nemania sp. (KX611644)
WZMG-Y-12
Diaporthe sp. (KX065032)
WZMG-J-8-2
Aureobasidium pullulans (JQ235065)
Guignardia camelliae (FJ462743)
Guignardia sp. (GU066700)
Phyllosticta capitalensis (LN828209)
LJZ-J-4
Phyllosticta capitalensis (Guignardia mangiferae) KP99848
WZMG-Y-24
WZMG-Y-4
Guignardia mangiferae (EU677815)
STJ-J-1
Corynespora cassiicola (MK139711)
Epicoccum nigrum (HQ728258)
Epicoccum sp. (JQ388284)
Epicoccum sp. (MK100174)
STJ-J-6-2
STJ-J-6-1
LJZ-J-2
LJZ-J-2-3
Leptosphaeria sp. (MG732994)
Leptosphaeria sp. (KX611651)
Curvularia eragrostidis (KP698723)
Curvularia sp. (KC113296)
STJ-J-5
WZMG-Y-1-1
Alternaria sp. (MH669498)
Alternaria alternata (MH567106)
Alternaria sp. (KJ935028)
WZMG-Y-16-1
WZMG-YB-1-C
Alternaria pharbitidis (JX418344)
Alternaria sp.(KC147565)
WZMG-J-8-1
WZMG-J-9
Schizophyllum commune (FJ426395)
Schizophyllum commune (MG231814)
Colletotrichum
Fusarium
Cladosporium
Nigrospora
Nemania
Diaporthe
Aureobasidium
Guignardia
(Phyllosticta)
Corynespora
Epicoccum
Leptosphaeria
Curvularia
Alternaria
Schizophyllum
0.050

以 WZMG、LJZ 和 STJ 前缀编号的菌株分别表示分离自温州蜜柑（*C. unshiu* Marc.，桂林）、沙糖桔（*C. reticulata* Blanco cv. Shatangju，桂林）和沙糖桔（*C. reticulata* Blanco cv. Shatangju，梧州）。Bootstrap=1 000，节间数字代表 Bootstrap 支持值。标尺长度代表遗传距离。

Isolates with prefix WZMG, LJZ and STJ were isolated from *C. unshiu* Marc. (Guilin), *C. reticulata* Blanco cv. Shatangju (Guilin) and *C. reticulata* Blanco cv. Shatangju (Wuzhou), respectively. The numbers at the branches indicated the percentages of trees from 1 000 bootstrap replication in which the branch occurs. Scale bar represented genetic distance.

图 1 基于 30 株内生真菌 ITS rDNA 序列所得的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic relationship analysis of the 30 fungal isolates from citrus to other fungi from GenBank, deduced from the ITS rDNA sequences

### 2.3 各组织中内生真菌的多样性与相似性

在选取的柑橘品种中，内生真菌的多样性为温州蜜柑>沙糖桔（桂林）>沙糖桔（梧州）。不同组织中内生真菌多样性指数大小分别为温州蜜柑中，叶（1.20）>枝（0.62）；桂林采集的沙糖桔中，叶（1.11）>枝（0.64）；梧州采集的沙糖桔中，叶（0.27）<枝（1.02）（表 4）。

从选取的柑橘品种各组织中分离的内生真菌的相似性指数在 0~0.22 的范围（表 5），其中，在采自桂林的温州蜜柑和沙糖桔中，二者叶片中的相似性最高，其次为温州蜜柑的叶与枝。而从梧州采集的沙糖桔的叶与其枝中内生真菌的相似性指数为 0，并且其叶与桂林采集的沙糖桔的叶、枝，以及其枝与桂林沙糖桔的枝、温州蜜柑的枝中内生真菌的相似性指数均为 0，表明从梧州采集柑橘抗病品种中的内生真菌与桂林采集的柑橘抗病品种中的内生真菌组成差异较大。

表 4 不同柑橘样品的叶片与枝条中内生真菌多样性指数

Table 4 Diversity indices of endophytic fungi isolated from the leaves and twigs of different citrus cultivars

| 项目 Item | WZMG | | LJZ | | STJ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 叶 Leaves | 枝 Twigs | 叶 Leaves | 枝 Twigs | 叶 Leaves | 枝 Twigs |
| 多样性指数 Shannon-Weiner index (*H'*) | 1.20 | 0.62 | 1.11 | 0.64 | 0.27 | 1.02 |

表 5 不同柑橘样品的叶片与枝条中内生真菌的相似性指数

Table 5 Similarity indices (CS) of genera of endophytic fungi isolated from the leaves and twigs of different citrus cultivars

| 柑橘样品 Citrus | 分离部位 Tissues | WZMG | LJZ | | STJ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 叶 Leaves | 叶 Leaves | 枝 Twigs | 叶 Leaves | 枝 Twigs |
| WZMG | 枝 Twigs | 0.2 | 0.11 | 0.14 | 0.17 | 0 |
| | 叶 Leaves | | 0.22 | 0.14 | 0.17 | 0.11 |
| LJZ | 叶 Leaves | | | 0.17 | 0 | 0.13 |
| | 枝 Twigs | | | | 0 | 0 |
| STJ | 叶 | | | | | 0 |

| | |
|---|---|
| | Leaves |

**2.4 柑橘内生真菌发酵产物对柑橘溃疡病菌抑制活性**

基于拮抗预试验结果，测定了 30 株内生真菌发酵产物粗提物对柑橘溃疡病菌的抑制活性，结果如表 6 所示。当内生真菌发酵粗提物处理浓度为 10 mg·mL$^{-1}$ 时，除内生真菌 WZMG-Y-27 外，其余 29 株菌株对柑橘溃疡病菌均具有抑制作用。进一步测定 29 株内生真菌对柑橘溃疡病菌的最低抑制浓度（表 6），发现 29 株内生真菌乙酸乙酯粗提物对柑橘溃疡病菌均有不同程度抑制作用，最低抑制浓度（MIC）介于 0.156~10 mg·mL$^{-1}$。本次选取的 16 株温州蜜柑内生真菌中，有 9 株（56.52%）菌株对柑橘溃疡病菌的 MIC 小于 1 mg·mL$^{-1}$；在选取的 7 株桂林沙糖桔内生真菌中，有 5 株（71.43%）菌株对柑橘溃疡病菌的 MIC 小于 1 mg·mL$^{-1}$；在选取的 7 株沙糖桔（梧州）内生真菌中，有 2 株（28.57%）菌株对柑橘溃疡病菌的 MIC 小于 1 mg·mL$^{-1}$。结果表明采自桂林的柑橘抗病品种的高活性菌株多于梧州的柑橘抗病品种。

不同柑橘抗病品种中的优势属及特有属菌株对柑橘溃疡病菌均具有不同程度的抑制活性。在温州蜜柑中，优势属和特有属对柑橘溃疡病菌的 MIC 分别介于 0.312 5~10 mg·mL$^{-1}$ 和 0.156 ~0.625 mg·mL$^{-1}$。其中，其特有属中的菌株 WZMG-Y-12（*Diaporthe*）、WZMG-J-8-1（*Schizophyllum*）和 WZMG-J-9（*Schizophyllum*）对柑橘溃疡病菌具有最佳抑制活性，MIC 均为 0.156 mg mL$^{-1}$；*Aureobasidium*、*Cladosporium* 也为仅分布于温州蜜柑中的菌属，该属菌株 WZMG-J-8-2、WZMG-J-1 对柑橘溃疡病菌也均有较好的抑制活性，MIC 分别为 0.312 5 mg·mL$^{-1}$ 和 0.625 mg·mL$^{-1}$；温州蜜柑中的优势属 *Colletotrichum*（27.78%）、*Alternaria*（15.28%）对柑橘溃疡病菌的分别 MIC 介于 0.312 5~10 mg·mL$^{-1}$ 和 0.625~10 mg·mL$^{-1}$。对于优势属 [*Guignardia* (*Phyllosticta*)]中的菌株，本次仅选取一株(WZMG-Y-24)进行测定。沙糖桔中的优势属及其特有属对柑橘溃疡病菌也具有不同程度抑制作用，MIC 分别介于 0.312 5~5 mg·mL$^{-1}$ 和 0.312 5~2.5 mg·mL$^{-1}$，其中 *Leptosphaeria* 既是其优势属，也是其特有属。此外，与其他柑橘样品的共有属 *Fusarium* 中的菌株 LJZ-Y-20 也对柑橘溃疡病菌表现了较好的抑制活性，MIC 为 0.312 5 mg·mL$^{-1}$。采自梧州的沙糖桔中的内生真菌优势属和特有属对柑橘溃疡病菌的 MIC 均介于 0.312 5~5 mg·mL$^{-1}$，其中 *Epicoccum* 既是其优势属，也是其特有属。

具有活性的内生真菌在不同组织中均有分布，枝条中含有的高活性菌株略多于叶片。在本次测定的 30 株内生真菌中，16 株分离自叶片，其中 8 株（50%）对柑橘溃疡病菌的 MIC<1 mg·mL$^{-1}$；14 株分离自枝条，8 株（57.14%）对柑橘溃疡病菌的 MIC<1 mg·mL$^{-1}$。

综上，采自桂林的柑橘抗病品种的高活性菌株多于梧州的柑橘抗病品种；内生真菌中的优势属及特有属中的部分菌株对柑橘溃疡病菌具有较好的抑制活性；具有活性的内生真菌在不同组织中均有分布，且枝条中含有的高活性菌株略多于叶片。

表 6 30 株柑橘内生真菌粗提物对柑橘溃疡病菌的抑制活性

Table 6 Inhibitory activities of the extracts of 30 fungal isolates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

| 菌株 Fungal isolates | 属 Genus | 抑制活性 Inhibitory activity (10 mg mL$^{-1}$) | 最低抑制浓度 MIC (mg mL$^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| WZMG-Y-12 | 间座壳属 *Diaporthe* | --- | 0.156 |
| WZMG-J-8-1 | 裂褶菌属 *Schizophyllum* | --- | 0.156 |
| WZMG-J-9 | 裂褶菌属 *Schizophyllum* | --- | 0.156 |
| WZMG-Y-6 | 刺盘孢属 *Colletotrichum* | --- | 0.312 5 |
| WZMG-J-8-2 | 短梗霉属 *Aureobasidium* | --- | 0.312 5 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| STJ-J-5 | 弯孢霉属 *Curvularia* | --- | 0.312 5 |
| STJ-J-3-6 | 镰刀属 *Fusarium* | --- | 0.312 5 |
| LJZ-J-4 | 球座菌属 [*Guignardia* (*Phyllosticta*)] | --- | 0.312 5 |
| LJZ-Y-7 | 黑孢属 *Nigrospora* | --- | 0.312 5 |
| LJZ-Y-11 | 炭垫属 *Nemania* | --- | 0.312 5 |
| LJZ-Y-20 | 镰刀属 *Fusarium* | --- | 0.312 5 |
| LJZ-J-2 | 小球腔菌属 *Leptosphaeria* | --- | 0.625 |
| WZMG-Y-1-2 | 镰刀属 *Fusarium* | --- | 0.625 |
| WZMG-Y-16-1 | 链格孢属 *Alternaria* | --- | 0.625 |
| WZMG-Y-24 | 球座菌属 [*Guignardia*(*Phyllosticta*)] | --- | 0.625 |
| WZMG-J-1 | 枝孢属 *Cladosporium* | --- | 0.625 |
| WZMG-Y-35 | 刺盘孢属 *Colletotrichum* | --- | 1.25 |
| STJ-Y-1-B | 刺盘孢属 *Colletotrichum* | --- | 1.25 |
| WZMG-YB-1 | 链格孢属 *Alternaria* | --- | 2.5 |
| WZMG-Y-2 | 刺盘孢属 *Colletotrichum* | --- | 2.5 |
| WZMG-Y-21 | 刺盘孢属 *Colletotrichum* | --- | 2.5 |
| LJZ-J-2-3 | 小球腔菌属 *Leptosphaeria* | --- | 2.5 |
| STJ-J-1 | 棒孢属 *Corynespora* | --- | 2.5 |
| STJ-J-3-1 | 镰刀属 *Fusarium* | --- | 2.5 |
| STJ-J-6-1 | 附球菌属 *Epicoccum* | --- | 5 |
| STJ-J-6-2 | 附球菌属 *Epicoccum* | --- | 5 |
| LJZ-Y-12 | 球座菌属 [*Guignardia*(*Phyllosticta*)] | --- | 5 |
| WZMG-J-5 | 刺盘孢属 *Colletotrichum* | --- | 10 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| WZMG-Y-1-1-2 | 链格孢属 *Alternaria* | --- | 10 |
| WZMG-Y-27 | 刺盘孢属 *Colletotrichum* | +++ | — |

注：“---”表示未长菌，“+++”表示长菌；“—”表示无抑菌活性。

Note: “---” indicates no bacteria, “+++” indicates bacteria growing; “—” indicates no antibacterial activities.

## 3 讨论

本次从柑橘抗病品种中总共分离得到72株内生真菌，归为14个属。分离的菌株数量显著少于前人报道的从柑橘中分离的内生真菌数量（罗永兰等, 2005a; 2005b; Juybari et al., 2019; Nicoletti, 2019; Sadeghi et al., 2019），可能与采集的柑橘品种、采集时间、采集地点、样本量及分离过程中的消毒方法等多种因素有关（罗永兰等, 2005b; 王利娟和贺新生, 2006; Juybari et al., 2019; Sadeghi et al., 2019）。Petrini & Fisher（1986）曾提出偶见种或稀有种的检出概率通常与采样量的大小成正比。不同样品、不同组织部位消毒时间的差异也会显著影响内生真菌的分离（王利娟和贺新生, 2006）。因此，后续可对柑橘不同品种、不同组织部位内生真菌分离纯化的消毒时间进行系统优化，并增加样本量（包括扩大柑橘品种数量，更多组织部位、分布地点，不同年份及季节等）的采集和分离。

不同采集地的柑橘抗病品种中内生真菌的分布差异较大。温州蜜柑的内生真菌多样性最高，其次为采自桂林的沙糖桔，而采自梧州沙糖桔中的内生真菌多样性最低。并且，采自桂林的柑橘样品枝叶中内生真菌多样性变化与采自梧州的有所不同，桂林柑橘样品中均为叶片中内生真菌多样性高于枝条，而梧州柑橘样品中的叶片内生真菌多样性低于枝条。另外，采自梧州的沙糖桔叶片中的内生真菌与采自桂林的沙糖桔枝、叶中的内生真菌相似指数均为0，其枝条中的内生真菌与桂林沙糖桔和温州蜜柑枝条中的内生真菌相似指数也均为0。不同柑橘样品中的优势属有所差异，温州蜜柑的优势属为 *Colletotrichum*、*Alternaria* 及 *Guignardia* (*Phyllosticta*)，采自桂林的沙糖桔的优势属为 *Guignardia* (*Phyllosticta*)、*Leptosphaeria*，采自梧州的沙糖桔的优势属为 *Fusarium*、*Epicoccum*、*Colletotrichum*。前人报道的来自不同柑橘样品中的内生真菌优势属也存在一定差异，如 Juybari et al.（2019）报道的柑橘（*Citrus sinensis*）内生真菌的优势属为 *Alternaria*；罗永兰等（2005a）从温州蜜柑（柑类）、甜橙（橙类）、文旦柚（柚类）中分离鉴定的24个属中，*Colletotrichum*、*Alternaria* 和 *Fusarium* 为优势属；Durán et al.（2005）报道的柠檬（*Citrus limon*）内生真菌的优势属为 *Colletotrichum*；Araújo et al.（2001）报道的不同柑橘品种中内生真菌的优势属为 *Colletotrichum*、*Guignardia* 和 *Cladosporium*。以上研究表明，植物中内生真菌群落结构受宿主及其分布的地理位置影响（Durán et al., 2005; 罗永兰等, 2005b; 高剑, 2013; 黄谦, 2015; Sadeghi et al., 2019）。Summerbell（2005）研究指出相差几平方公里的生长区就可能影响根部真菌的群体结构。罗永兰等（2005b）研究发现柑橘内生真菌种群出现的频率随地理纬度的升高而降低。但本研究结果并不符合此规律，可能与样本量较小无法体现出规律有关，也可能是受降水量等其他因素影响。相似的，Loro et al.（2012）发现委内瑞拉西北部三个不同环境的草本植物内生真菌的多样性和定殖率与纬度呈负相关，但干旱、半干旱环境可能因为条件特殊而不符合此规律。另外，Carroll et al.（1978）研究发现花旗松内生菌的定殖率可能与年降水量成正相关。此外，有研究发现柑橘种子中未发现内生真菌存在，推测柑橘中的内生真菌并非垂直传播，而是来自周围环境（Nicoletti, 2019）。植物内生菌可来源于空气、雨水和土壤等，不断从环境中积累，进而使内生菌组成表现出地理差异性。此外，柑橘产区的土壤成分、农药的喷施、肥料的施用等也可能对内生真菌的组成和分布具有影响（Tian et al., 2004; Eschen et al., 2010; Peršoh, 2013; Sadeghi et al., 2019），但具体的影响机制还有待更深入的研究。

不同组织中的内生真菌群落结构差异较大，部分菌株的分布具有组织偏好性。采自桂林

的温州蜜柑和沙糖桔均为叶片中的内生真菌的多样性高于枝条；而采自梧州的沙糖桔为叶片中的多样性低于枝条。叶片中的优势属为 *Alternaria*、*Colletotrichum*、*Guignardia* (*Phyllosticta*)，枝条中的优势属为 *Fusarium*、*Schizophyllum*、*Epicoccum*。其中，*Alternaria*、*Diaporthe*、*Nemania* 和 *Nigrospora* 仅分布在叶片中，*Aureobasidium*、*Cladosporium*、*Leptosphaeria*、*Curvularia*、*Epicoccum*、*Corynespora*、*Schizophyllum* 仅分布在枝条中，该结果与前人研究结果有较大差异。如 Sadeghi et al.（2019）研究柑橘（*Citrus reticulata* cv. Siyahoo）不同组织（叶、枝、主干、根）中内生真菌组成差异，发现 *Alternaria* 也仅分布于叶片中，但 *Aureobasidium* 在叶、枝、主干中都有分布，*Cladosporium* 分布于所有研究的组织中。殷恭毅等（1981）在柑橘主干主枝皮层、1 到 3 年生小枝皮层及当年生叶片中均发现含有 *Alternaria*，而 *Cladosporium* 和 *Curvularia* 仅存在于叶片中。罗永兰（2005a）研究发现 *Alternaria* 在主干皮层、枝条、果皮、叶和根中均有分布。以上不同研究结果进一步表明，不同年份、不同季节、不同地点采集的不同柑橘植株，其内生真菌的分布情况均有可能不同（罗永兰等, 2005 a, b; Sadeghi et al., 2019）。

柑橘抗病品种中含有的内生真菌普遍具有抗柑橘溃疡病菌活性，优势属及特有属中的部分菌株对柑橘溃疡病菌均具有较好的抑制活性。选取的 30 株内生真菌中，有 29 株具有抗柑橘溃疡病菌的活性，共归为 14 个属。由此可见，柑橘中可产生抗柑橘溃疡病菌活性代谢产物的内生真菌是具有丰富多样性的。柑橘抗病品种的优势属中的不同菌株对柑橘溃疡病菌具有不同程度抑制活性，MIC 介于 0.312 5~10 mg • $mL^{-1}$；特有菌属对柑橘溃疡病菌的 MIC 介于 0.156~5 mg • $mL^{-1}$，总体优于柑橘抗病品种中优势属。并且，本次从温州蜜柑叶中分离得到的 *Diaporthe* 属的菌株 WZMG-Y-12，以及从枝中分离得到的 *Schizophyllum* 属的菌株 WZMG-J-8-1 和 WZMG-J-9 表现的抗菌活性最佳。其中，*Diaporthe* 属真菌既是柑橘及其他植物中广泛存在的内生真菌菌属（Huang et al., 2015; Cui et al., 2017; Brissow et al., 2017），同时也是柑橘及其他植物中广泛存在的病原菌属（Gomes et al., 2013; 黄峰, 2015; 李媛等, 2017）。已有大量研究表明该属内生真菌代谢产物具有广谱抗菌活性（Chepkirui & Stadler, 2017）。也有报道表明 *Schizophyllum* 属内生真菌可产生具有显著抗菌活性的代谢产物（Vieira et al., 2012; 李元铭, 2016）。以上研究表明 *Diaporthe*、*Schizophyllum* 属菌株对其宿主温州蜜柑防御柑橘溃疡病菌侵害可能具有极为重要的作用。有关特有属与柑橘抗病性互作关系有待后续进一步深入研究。此外，此次研究的柑橘抗病品种中均含有镰刀属，且该属菌株均表现出显著抑菌活性。郭东升等（2020）研究发现柑橘内生镰刀属菌株（*Fusarium avenaceum* Gds-1）发酵产物对柑橘青霉病具有高效稳定的防治效果；赵昌会等（2008）研究发现柑橘内生镰刀属菌株对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及黑曲霉均具有抑制作用。以上研究表明，镰刀属内生真菌产生的代谢产物对柑橘防御病害可能具有重要作用，后期可加强该方面研究。

综上，柑橘抗病品种中含有丰富的内生真菌资源，内生真菌的组成及高活性菌株数量的分布受宿主、组织及地理位置影响。但本研究未系统性研究同一果园不同柑橘抗病品种中内生真菌的组成、分布及其抗菌活性与柑橘抗病性的关系。另外，有关柑橘内生真菌次生代谢产物抗菌活性方面的研究仍较少，且尚未见有关柑橘内生真菌发酵产物抑制柑橘溃疡病菌的研究报道。后续可深入探讨柑橘抗病品种中内生真菌种类、抗菌活性与其宿主抗病性关系，进一步挖掘柑橘中的活性内生真菌，并研究活性菌株的活体抗菌活性，以及其活性成分和作用机制，为开发可替代的杀菌剂防治柑橘溃疡病以及柑橘产业的可持续发展奠定基础。

**参考文献：**

ABDALLA MA, MATASYOH JC, 2014. Endophytes as producers of peptides: an overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes[J]. Nat Prod Bioprospect, 4(5): 257-270.

ARAÚJO WL, MACCHERONI W, AGUILAR-VILDOSO CI, et al., 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks[J]. Can J Microbiol, 47(3): 229-236.

BRISSOW ER, DA SILVA IP, DE SIQUEIRA KA, et al., 2017. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum*-92C, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler.[J]. Parasitol Res, 116(7): 1823-1830.

CARROLL GC, CARROLL FE, 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest[J]. Can J Bot, 56(24): 3034-3043.

CHEN XF, ZHANG HL, ZHAO L, 2017. Isolation and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on lemon sample from Tai-wan[J]. Acta Agric Zhejiang, 29(1):101-105. [陈先锋，张慧丽，赵雷，2017. 台湾柠檬上柑橘溃疡病菌的分离鉴定[J]. 浙江农业学报，29(1)：101-105.]

CHOWDHARY K, KAUSHIK N, 2015. Fungal endophyte diversity and bioactivity in the Indian medicinal plant *Ocimum sanctum* Linn[J]. PLoS ONE, 10(11): 1-25.

CHEPKIRUI C, STADLER M, 2017. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites[J]. Mycol Progress, 16: 477-494.

CUI H, DING M, HUANG D, et al., 2017. Chroman-4-one and pyrano [4, 3-b] chromenone derivatives from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum* SKS019[J]. Rsc Adv, 7(33): 20128-20134.

DING X, LIU K, DENG B, et al., 2013. Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata*[J]. World J Micobiol Biotechnol, 29(10): 1831-1838.

DURÁN EL, PLOPER LD, RAMALLO JC, et al., 2005. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina[J]. Can J Bot, 83(4): 350-355.

ESCHEN R, HUNT S, MYKURA C, et al., 2010. The foliar endophytic fungal community composition in *Cirsium arvense* is affected by mycorrhizal colonization and soil nutrient content[J]. Fungal Biol, 114(11-12): 991-998.

FE ANDRÉS M, ELISA DIAZ C, GIMÉNEZ C, et al., 2017. Endophytic fungi as novel sources of biopesticides: the Macaronesian Laurel forest, a case study[J]. Phytochem Rev, 16(5): 1009-1022.

GAO J, 2013. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with mangroves[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University: 106-111. [高剑，2013. 内生真菌多样性及其生态分布[D]. 湛江：广东海洋大学：106-111.]

GLIENKE C, PEREIRA OL, STRINGARI D, et al., 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with citrus black spot[J]. Persoonia, 26: 47-56.

GOMES RR, GLIENKE C, VIDEIRA SIR, et al., 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi[J]. Persoonia, 31:1-41.

GUARNACCIA V, GROENEWALD JZ, LI H, et al., 2017. First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe[J]. Stud Mycol, 87: 161-185.

GUO DS, YUAN CH, ZHAI YY, et al., 2020. Research on citrus endophytic *Fusarium avenaceum* Gds-1 for citrus blue mold control[J/OL]. Chin J Pestic Sci: 1-12. https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2020.0085. [郭东升，原晨虹，翟颖妍，等，2020. 柑橘内生燕麦镰刀菌 Gds-1 对柑橘青霉病的防治研究[J/OL]. 农药学学报：1-12. https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2020.0085.]

HUANG F, 2015. Molecular systematic reconstruction of the species relationships of important *Citrus* pathopenic fungi[D]. Hangzhou: Zhejiang University: 129-131. [黄峰，2015. 分子系统学重构柑橘重要病原真菌的种类关系[D]. 杭州：浙江大学：129-131. ]

HUANG F, UDAYANGA D, WANG X, et al., 2015. Endophytic *Diaporthe* associated with *Citrus*: a phylogenetic reassessment with seven new species from China[J]. Fungal Biol, 119(5): 331-347.

HUANG Q, 2015. The research on diversity of endophytic fungi associated with *Kadsura angustifolia* and their fermentation[D]. Chongqing: Southwest University: 45-46. [黄谦，2015. 狭叶南五味子内生真菌多样性及其发酵研究[D]. 重庆：西南大学：45-46.]

JUYBARI HZ, GHANBARY MAT, RAHIMIAN H, et al., 2019. Seasonal, tissue and age influences on frequency and biodiversity of endophytic fungi of *Citrus sinensis* in Iran[J]. For Pathol, 3: 1-11.

LAMICHHANE J, OSDAGHI E, BEHLAU F, et al., 2018. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture: A review[J]. Agron Sustain Dev, 38(3): 28, pp. 1-18 .

LI Y, SHI LB, FEI NY, et al., 2017. Identification and biological characteristcs of a blueberry *Diaporthe* stem canker pathogen[J]. Plant Prot, 43(1): 89-94. [李媛，石凌波，费诺亚，等，2017. 蓝莓间座壳茎溃疡病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 植物保护，43(1): 89-94.]

LI Y, QU PH, CHEN DK, et al., 2015. Application and evaluation for sequencing analysis based on internal transcribed spacer gene for identification of 89 strains of pathogenic fungi[J]. Chin J Clin Lab Sci, 33(11): 860-863. [李营，屈平华，陈东科，等，2015. ITS 基因测序分析对 89 株病原真菌鉴定的应用评价[J]. 临床检验杂志，33(11)：860-863.]

LI YM, 2016. Studies on the secondary metabolites of three mangrove endophytic fungi from South China Sea[D]. Alear: Tarim University: 52-53. [李元铭，2016. 三株南海红树林来源内生真菌次级代谢产物研究[D]. 阿拉尔：塔里木大学：52-53.]

LORO M, VALERO-JIMÉNEZ CA, NOZAWA S, et al., 2012. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela[J]. J Arid Environ, 85: 46-55.

LOU JF, FU LY, LUO RY, et al., 2013. Endophytic fungi from medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activity[J]. Afr J Microbiol Res, 7(47): 5343-5349.

LUO YL, ZHANG ZY, RAN GH, 2005a. Isolation and identification of endophytic fungi in citrus[J]. J Hunan Agric Univ (Nat Sci Ed), 31: 418-421. [罗永兰，张志元，冉国华，2005a. 柑橘内生真菌的分离与鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版)，31：418-421.]

LUO YL, ZHANG ZY, RAN GH, 2005b. Research on ecology of endophytic fungi in *Citrus* [J]. J Hunan Agric Univ(Nat Sci Ed), 5: 81-84. [罗永兰，张志元，冉国华，2005b. 柑橘内生真菌的生态研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版)，5：81-84.]

NICOLETTI R, 2019. Endophytic fungi of citrus plants[J]. Agriculture, 9(12): 1-13.

MU LY, 1994. Research methods of plant chemical protection[M]. Beijing: Chinese Agricultural Press: 72-82. [慕立义，1994. 植物化学保护研究方法[M]. 北京：中国农业出版社：76-82.]

PENA LC, JUNG LF, SAVI DC, et al., 2017. A *Muscodor* strain isolated from *Citrus sinensis* and its production of volatile organic compounds inhibiting *Phyllosticta citricarpa* growth[J]. J Plant Dis Prot-New, 124(4): 349-360.

PERŠOH D, 2013. Factors shaping community structure of endophytic fungi-evidence from the *Pinus*-*Viscum*-system[J]. Fungal Divers, 60(1): 55-69.

PETRINI O, FISHER P, 1986. Fungal endophytes in Salicornia perennis[J]. Trans Brit Mycol Soc, 87(4): 647-651.

REN JG, 2006. Studies on pathogen profiles and epidemiology of citrus canker disease in Guangxi[D]. Nanning: Guangxi University: 124-127. [任建国，2006. 广西柑橘溃疡病病原分析与流行学研究[D]. 南宁：广西大学：124-127.]

RODRIGUEZ R, WHITE J, ARNOLD A, et al., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles[J]. New Phytol, 182(2): 314-330.

SAVIETTO A, POLAQUINI CR, KOPACZ M, et al., 2018. Antibacterial activity of monoacetylated alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*[J]. Arch Microbiol, 200(6): 929-937.

SADEGHI F, SAMSAMPOUR D, SEYAHOOEI MA, et al., 2019. Diversity and spatiotemporal distribution of fungal endophytes associated with *Citrus reticulata* cv. Siyahoo[J]. Curr Microbiol, 76: 279-289.

SUMMERBELL RC, 2005. Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: influence of site factors on fungal distributions[J]. Stud Mycol, 53(1): 121-145.

TIAN XL, CAO LX, TAN HM, et al., 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*[J]. World J Microbiol & Biotechnol, 20(3): 303-309.

TRAN NT, MILES AK, DIETAGEN RG, et al., 2019. *Phyllosticta capitalensis* and *P. paracapitalensis* are endophytic fungi that show potential to inhibit pathogenic *P. citricarpa* on citrus[J]. Australas Plant Pathol, 48: 281-296.

VENUGOPALAN A, SRIVASTAVA S, 2015. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites[J]. Biotechnol Adv, 33(6): 873-887.

VIEIRA MLA, HUGHES AFS, GIL VB, et al., 2012. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae)[J]. Can J Microbiol, 58(1): 54-66.

WANG LJ, HE XS, 2006. Research methods of the isolation and sublimation of plant endophytical fungi[J]. J Microbiol, 26(4): 55-60. [王利娟，贺新生，2006. 植物内生真菌分离培养的研究方法[J]. 微生物学杂志，26(4)：55-60.]

WEI JC, 1979. Fungal identification manual[M]. Shang Hai: Shanghai Science and Technology Press. [魏景超，1979. 真菌鉴定手册[M]. 上海：上海科学技术出版社.]

WU SM, 2018. Relativity study between endophytic bacteria flora of different orange varieties and resistance or susceptibility of host to citrus canker[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University: 29-30. [吴思梦，2018. 柑橘抗/感溃疡病品种内生细菌菌群差异与寄主抗病的相关性研究[D]. 南昌：江西农业大学：29-30.]

XU XL, LUO HY, YAN XJ, et al., 2020. Study on the diversity of endophytic fungi isolated from *Siraitia grosvenorii* [J]. Guihaia, 40(5): 618-627. [徐祥林，骆海玉，颜小婕，等，2020.罗汉果内生真菌多样性研究[J]. 广西植物, 40(5): 618-627.]

YAN Y, LI WP, GAO WJ, et al., 2008. Application of rDNA ITS sequence analysis in fungus identification[J]. Chi J Health Lab Technol, 18(10): 1958-1961. [燕勇，李卫平，高雯洁，等，2008. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志，18(10)：1958-1961.]

YAO TS，ZHOU Y，ZHOU CY, 2015. Research development of the differentiation and control of citrus bacterial canker disease[J]. Acta Hort Sin, 42 (9): 1699-1706. [姚廷山，周彦，周常勇，2015. 柑橘溃疡病菌分化及防治研究进展[J]. 园艺学报，42 (9)：1699-1706.]

YIN GY, LIU KJ, WEI DW, 1981. Investigation of latent infection of pathogenic fungi in the tissues of citrus trunks, teigs and leaves[J]. J Nanjing Agric Univ, (4): 54-61. [殷恭毅，刘克均，魏大为，1981. 柑桔枝干皮层及叶片组织内潜伏侵染病菌的调查研究[J]. 南京农业大学学报，(4)：54-61.]

ZHAO CH, HUANG F, DING F, 2008. Isolation and preliminary study of antimicrobial activities of endophytic fungi in citrus plants[J]. J Hunan Univ Sci Eng, 29: 72-73. [赵昌会，黄芳，丁芳，2008. 柑橘内生真菌的分离及抗菌活性的初步研究[J]. 湖南科技学院学报，12：72-73.]

ZHEN B, YING CM, WANG YP, et al., 2011. Evaluation on rDNA-internal transcribed spacer regions as targets for molecular identification of clinical uncommon filamentous fungi[J]. Lab Med, 26(10): 648-652. [郑冰，应春妹，汪雅萍，等，2011. rDNA-ITS 序列分析对临床少见丝状真菌鉴定作用的评估[J]. 检验医学，26(10)：648-652.]